

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln  
( Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack )  
und  
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit EURATOM  
München  
( Leiter: Prof. Dr. W. Stich )

---

# Die Einwirkung von Dimethylsulfoxid auf menschliches Knochenmark in vitro

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Johannes Bornhöft  
aus Berlin

1971



Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln  
( Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack )

und

aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit EURATOM  
München

( Leiter: Prof. Dr. W. Stich )

---

# Die Einwirkung von Dimethylsulfoxid auf menschliches Knochenmark in vitro

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Johannes Bornhöft

aus Berlin

Referent: Frau Prof. Dr. med. I. Boll

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Gerhartz

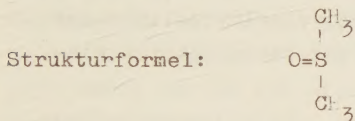


Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche  
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 3. Dezember 1971

### Einleitung.

Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde erstmals 1866 von Alexander Saytzeff in Kasan (Russland) synthetisiert.(1)



Das DMSO-Molekül ist pyramidenförmig gebaut, es hat ein Dipolmoment von 3,96 D, das mehr als doppelt so hoch ist, wie das von Wasser (1,8 D).

Infolge der starken Polarität der Schwefel-Sauerstoffbindung hat DMSO eine hohe Dielektrizitätskonstante.

Es stellt ein vielseitiges Lösungsmittel mit ähnlichen Eigenschaften wie der Äthylalkohol dar, ist in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar und verändert die Wasserstoffbindung in organischen Molekülen.(2)

Nachdem DMSO schon einige Zeit in der Papier- und Kunststoffindustrie als vielseitiges Lösungsmittel verwendet wurde, berichteten erstmals Lovelock und Bishop 1959, daß DMSO bei der Konservierung lebender Zellen durch Gefrieren Schäden verhindern kann (3). Weitere Anwendungsbereiche von DMSO in der Medizin ergaben sich, nachdem 1964 Jacob und andere über die hohe Penetrationsfähigkeit des Dimethylsulfoxids durch die menschliche Haut und andere biologische Membranen berichteten.(4,5)

Seitdem ist eine große Anzahl von medizinischen Veröffentlichungen über DMSO erschienen, hauptsächlich Toxizitätsuntersuchungen an den üblichen Versuchstieren und Berichte über seine Verwendung in der Humanmedizin bei der Behandlung von traumatischen, chronisch-entzündlichen und rheumatischen Läsionen des Bewegungsapparates besonders auch bei Sportunfällen. Weiterhin erschienen Arbeiten über seine Eigenschaften als perkutaner Resorptionsvermittler für andere Pharmaka und bei der Therapie diverser entzündlicher, chronisch-indurierender und sklerosierender Hauterkrankungen.

Unter den Arbeiten über DMSO als Schutzstoff für die Konservierung verschiedener Organe und Gewebe durch Einfrieren nimmt besonders das Gebiet der Blut- und Knochenmarkkonservierung breiten Raum ein. Dabei erwies sich DMSO als für diesen Zweck besser geeignet als Glycerin, Polyvinylpyrrolidin und andere untersuchte Substanzen. (Lovelock, Bishop, Cavins, Djerrassi, Farrant, Bouroncle u.a. )

Über den eigentlichen Mechanismus der biologischen Wirkung von DMSO bestehen noch gewisse Unklarheiten.

Zu seiner Fähigkeit, biologische Membranen zu durchdringen, gibt Muset (6) an, daß DMSO die Struktur ungesättigter Fettsäuren, die als Bestandteile von Phospholipiden am Aufbau der "Unit Membrane" (7) beteiligt sind, so verändert, daß Poren in dieser Membrane entstehen können; diese wären groß genug, um zum Beispiel ein Natriumion mit seiner Hydrathülle passieren zu lassen. Rammler und Zaffaroni (8) zeigen, daß DMSO aufgrund seiner Eigenschaft, Wassermoleküle ersetzen zu können, die Hydrathülle von Proteinen, Polysacchariden, Nucleinsäuren und anderen biologischen Substraten verändern und so deren biologische Eigenschaften beeinflussen kann. Sie zitieren Befunde von Herskovits und Laskovsky, nach denen DMSO in Proteinen die Berührungspunkte der Untereinheiten des Makromoleküls beeinflussen und so deren Tertiärstruktur verändern kann.

Nach Arbeiten von Helmkamp und Ts'o (9) verloren aus Kalbsthymus gewonnene DNS und aus Erbsenribosomen gewonnene RNS ihre Helixkonfiguration, wenn sie bei Zimmertemperatur in 100% DMSO gelöst wurden. Dieser dem normalerweise bei etwa 85°C eintretenden "Schmelzen" der DNS vergleichbare Vorgang war irreversibel. Als Begründung wird die Einwirkung des stark polaren DMSO auf die für die Helixkonfiguration wichtige Wasserstoffbindung angenommen.

Ähnliche Befunde hat Kuschinsky erhoben (10).

Über die Einwirkung auf Zellorganellen schreibt Misch (11), daß sich bei Untersuchungen der Phosphataseaktivität von Lysosomensuspensionen aus Rattenleberhomogenisaten eine starke Erhöhung dieser Enzymaktivität in den Versuchsansätzen gegenüber der in den Kontrollen fand, wobei er nachweisen konnte, daß es

nicht zu einer Zerstörung der Lysosomenmembrane kam. Als Ursache wird eine reversible Erhöhung der Membranpermeabilität angenommen.

Entsprechend berichtet Altland (12), daß DMSO in einer Dosis von 4,5g/Kg Körpergewicht vor körperlicher Arbeit verabreicht, bei Ratten den Übertritt von Enzymen aus verschiedenen Geweben in das Serum bewirkt; außerdem ließ sich sonst nur in den Mitochondrien nachweisbare Malatdehydrogenaseaktivität im Serum feststellen.

Wacker und Mohrbutter (13) fanden, daß zellfreie Homogenisate aus *Escherichia Coli* unter 7 bis 10 Prozent DMSO bei Inkubation mit Aminosäuren 3 bis 4 mal so viel Phenylalanin einbauten wie die Kontrollansätze. Dabei war die Wirkung von DMSO an den Ribosomenreichtum der Ansätze gebunden.

An Zellkulturen von Fibroblasten fanden Berliner und Ruhmann (14) unter der Einwirkung von DMSO in Konzentrationen von mehr als drei Prozent eine reversible Wachstumshemmung; entsprechend stellten Chang und Simon (15) eine starke Hemmung des Einbaus von tritiummarkiertem Thymidin in He-La Zellkulturen bei Zusatz von mehr als drei Prozent DMSO fest.

Malinin und Perry (16) sahen bei kurzdauernder Exposition (30 min. bis zwei Stunden) von He-La Zellkulturen gegen DMSO-Konzentrationen bis zu 15% und anschließender Züchtung in DMSO-freiem Medium bis 96<sup>h</sup> gegenüber den Kontrollen keine Wachstumsunterschiede; sie berichten aber über atypische Zellbilder und Mitosefiguren, deren relative Häufigkeit der DMSO-Konzentration proportional war.

Richards und Persitzky (17) stellten bei Untersuchungen am Knochenmark der Ratte eine erhebliche Abnahme der überlebenden Zellen nach 24-stündiger Kultur bei DMSO-Konzentrationen von 0,1 bis 5,0 Prozent fest.

Schreck fand auf Grund morphologischer Kriterien, daß DMSO in Konzentrationen von über 2 Prozent für neutrophile Granulocyten toxisch ist, ab 4 Prozent auch für Lymphocyten (18). Bouroncle gibt an, daß DMSO ab 12,5 Prozent für reife Granulocyten toxischer als für die unreifen Formen ist (19).

### Fragestellung

Bei diesen zum Teil widersprüchlichen Befunden stellt sich die Frage, ob DMSO einen Einfluß auf die Proliferation, d.h. die Entstehung neuer Zellen durch mitotische Zellteilung und die Ausreifung menschlichen Knochenmarkes hat, insbesondere hinsichtlich seiner Verwendung als Schutzstoff für die Knochenmarkkonservierung.

### Methode

Da die Proliferation in vivo sowohl durch humorale als auch durch neurale Faktoren beeinflusst wird, (20,21) erscheint nur eine in-vitro-Methode, die solche Einflüsse sicher ausschaltet, anwendbar. Ein relativ einfaches und billiges Verfahren stellt hier die Deckglaskultur nach Carell, mod. nach Boll, dar. (22)

### Ausführung

Von 10 an verschiedenen, z.T. haematologischen Erkrankungen leidenden Patienten wurde Knochenmark in der üblichen Weise durch Sternalpunktion gewonnen. Davon wurde jeweils ein Ausstrich -das Original- sofort nach der Punktion angefertigt und nach der Methode von Pappenheim gefärbt. Das übrige Material wurde in ein mit einigen Tropfen Heparinlösung versehenes steriles Uhrglasschälchen gespritzt. Von dort wurden die Knochenmarkpartikel unter sterilen Bedingungen in ein Medium, das 30 i.E. Heparin in 100 ml Hank's Lösung enthält, übernommen und wie folgt verarbeitet:

Auf einem Objektträger wird ein großer Tropfen einer Mischung aus

- 5 Teilen Eigenplasma (des betr. Patienten)
- 4 Teilen Hank's Lösung
- 1 Teil Corrhormon

aufgebracht, der nach wenigen Minuten gerinnt.

Auf dieses Koagulum wird ein Knochenmarksbröckchen gesetzt, und mit einem sehr kleinen Tropfen Eigenserum bedeckt.

Über das ganze kommt ein Hohlschliffobjektträger, der mit Vaseline befestigt und mit Hartparaffin luftdicht mit dem

Objektträger verbunden wird, um das Koagulum mit dem Knochenmarkbröckchen in einer kleinen Kammer luftdicht einzuschließen. Die so entstandenen Kulturen werden umgedreht, sodaß der Knochenmarkpartikel unter dem Koagulum hängt, und für 24<sup>h</sup>, 48<sup>h</sup> und 72<sup>h</sup> bebrütet bei 37° C .

Ebenso wurden die Versuchskulturen angefertigt, das Züchtungsmedium hatte hierbei folgende Zusammensetzung:

- 5 Teile Eigenplasma
- 3 Teile Hank's Lösung
- 1 Teil Corrhormon
- 1 Teil DMSO 10%

sodaß im Züchtungsmedium eine Endkonzentration von 1% DMSO vorhanden war. Auch in dem das Knochenmarkbröckchen bedeckenden kleinen Tropfen Eigenserum befand sich 1% DMSO.

Daneben wurden in gleicher Weise bei 5 Fällen Kulturen mit einer Endkonzentration von 5% DMSO angesetzt.

#### Auszählung und Auswertung

Nach der Bebrütung wurden sofort Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Für die Auswertung wurden nur die jeweils am besten erhaltenen Ausstriche berücksichtigt. In diesen Präparaten wurden je 1000 Zellen aus dem Randschleier differenziert, da dort die Zellen morphologisch am besten erhalten und wegen ihrer aufgelockerten Lage gut zu unterscheiden sind.

Dabei wurden für jeden Versuch und die entsprechenden Kontrollen bei 24, 48 und 72 Stunden die folgenden Parameter bestimmt:

- A. Der Mitoseindex MI, das ist das Verhältnis der gezählten Mitosen zu der Gesamtzahl der teilungsfähigen Zellen, ausgedrückt in Promille; jeweils getrennt für die rote und weiße Reihe.
- B. Die karyologische Kurve, d.h. die graphische Darstellung der prozentualen Häufigkeit, mit der die einzelnen Mitosephasen in der Gesamtzahl aller Zellteilungsvorgänge auftraten.
- C. Die Reifungskurven, d.h. die graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der einzelnen Reifungsstufen nach

0, 24, 48 und 72 Stunden getrennt für die rote und weiße Reihe eines jeden Patienten.

D. Der G/E Index, der das Verhältnis der Anzahl der weißen zu der der roten Zellen angibt.

Die Differenzierung erfolgte nach den von Boll angegebenen Kriterien und nach (23):

### Erythropoese

#### 1. Proerythroblast ( PE )

Der Zellkern ist rund und zeigt eine gleichmäßige, ziemlich dichte Chromatinstruktur mit meist nur undeutlich hervortretenden Nucleoli. Das Cytoplasma ist kornblumenblau, es umgibt den Kern mit einem ziemlich dünnen, gleichmäßigen Saum. Um den Kern herum findet sich an einer Seite meist eine sichelförmige Aufhellung, das sogenannte Cytocentrum. Oft bildet das Cytoplasma am Rand kleine Ausstülpungen, sogenannte "Füßchen" .

#### 2. Basophiler Erythroblast ( bE )

Der Kern ist grobscholliger als bei 1., das stark basophile Cytoplasma umgibt den Kern in weniger gleichmäßigem, breiterem Saum.

#### 3. Polychromatischer Erythroblast ( pE )

Der Kern zeigt die charakteristische Radspeichenstruktur, er ist kleiner und dichter als in 2.. Wegen der beginnenden Haemoglobineinlagerung verändert er mit zunehmender Reife die Cytoplasmafarbe von grau-violett zu einem blassen grau-rosa.

#### 4. Oxyphiler Erythroblast ( oE )

Das Cytoplasma ist wie beim Erythrocyten vollständig oxyphil. Der Kern zeigt eine Radspeichenstruktur, ist aber kleiner, dichter und grobscholliger als bei 3..

#### 5. Reifer Erythroblast. ( rE )

Der Kern ist klein, er erscheint als strukturlose, schwarze oder dunkelblaue Scheibe. Das Cytoplasma ist meist wie bei 4. gefärbt, jedoch werden auch Zellen mit noch polychromatischem Cytoplasma, wenn der Kern wie oben beschrieben aussieht, als reife Erythroblasten bezeichnet.

## Granulopoese

### 1. Myeloblast (Mbl)

Der Kern ist häufig oval und an einer Seite leicht eingedellt, er zeigt oft eine gleichförmige, sehr feinnetzige Chromatinstruktur, "wie durch Milchglas anzusehen". Meist sind zwei bis drei ziemlich große, in der Farbe wenig abgesetzte Nucleoli zu erkennen. Das Cytoplasma ist weniger basophil als beim Proerythroblasten, und oft nicht ganz einheitlich gefärbt. In Kernnähe findet sich oft ebenfalls eine Aufhellungszone.

### 2. Promyelocyt (Prom)

Das Cytoplasma ist durch eine deutliche, azurophile grobkörnige Granulation gekennzeichnet. Die Kern-Plasmarelation ist gegenüber 1. zum Plasma hin verschoben. Der rundliche bis oval-bohnenförmige Kern erscheint dichter und dunkler als bei 1. Nucleoli treten kaum auf. Das Cytoplasma ist weniger basophil und zeigt erheblich größere perinucleäre Aufhellungen wie bei 1. .

### 3. Myelocyt (My)

Die Kern-Plasmarelation gleicht 2., das Plasma ist hellgrau bis zartrosa gefärbt, es zeigt keine azurophile Granulation mehr. Der ovale bis nierenförmige Kern verdichtet sich in seiner Struktur.

### 4. Metamyelocyt (Metam)

Wie 3., aber der Kern ist stärker eingebuchtet, er zeigt verschiedene Formen und ist in seiner Struktur dichter als bei 3. .

### 5. Stabkerniger Granulocyt (Stab)

Der Kern hat Stab- oder Wurstform angenommen, er ist erheblich dichter und dunkler als bei 4., das Cytoplasma entspricht der Vorstufe.

### 6. Segmentkerniger Granulocyt (Segm)

Das blaßgraue Cytoplasma zeigt wie bei 3., 4. u. 5. eine feine, oft kaum erkennbare Granulation, die neutrophil angefärbt ist. Der fast strukturlose, dunkelviolette Kern wird charakteristisch durch mindestens eine fadenförmige Brücke segmentiert. Da diese oft wegen der Überlappung der einzelnen Kernsegmente nicht zu erkennen ist, wird die Verminderung der Kernbreite um mindestens  $\frac{2}{3}$  als ausreichendes Merkmal für den Segmentkernigen angesehen.

Die Strukturlosigkeit der Kerne wird als Reifekriterium mitbewertet.

### 7. Eosinophiler Myelocyt (e My) u. eos. segmentkerniger Granuloc. (e Segm)

Sie sind durch große, braunrote oder rötliche Granula gekennzeichnet, sonst wie 3. bzw. 6. .

Die gefundenen Mitosen wurden nach Boll (22) wie folgt differenziert:

#### 1. Prophase

Die Zelle hat sich abgerundet, die Kernmembrane ist aufgelöst, Nucleolen sind nicht sichtbar. Die Kernsubstanz bildet ein festes Spirem.

#### 2. Frühe Metaphase

Die Chromosomen sind über die ganze Zelle verteilt, sie zeigen eine wurmförmige Gestalt. (Lockeres Spirem).

#### 3. Späte Metaphase

Die Chromosomen bilden eine Sternfigur, den Monaster.

#### 4. Anaphase

Aus dem Monaster ist ein Doppelstern, Diaster geworden. Die bisher runde Zelle hat Ellipsenform angenommen.

#### 5. Telophase

Sie stellt die Phase von der beginnenden Einschnürung bis zur endgültigen Teilung des Cytoplasmas dar. Aus dem Diaster ist ein lockeres Dispirem geworden.

#### 6. Rekonstruktionsphase

Sie dauert von der vollzogenen Durchschnürung des Cytoplasmas bis zur Ausbildung der beiden Tochterkerne mit Kernmembrane und Nucleolen.

## Ergebnisse:

Es wurden insgesamt 73.000 Zellen differenziert. Die zu erwartende Gesamtzahl von  $5 \times 10.000$  und  $5 \times 7.000 = 85.000$  Zellen wurde nicht erreicht, weil in einigen Fällen, meist bei den 72<sup>h</sup> Kulturen, wegen der schlecht erhaltenen Ausstriche keine 1.000 Zellen zu differenzieren waren, und weil in zwei Fällen, Nr. 2 u. Nr. 9, die 72<sup>h</sup> Kulturen nicht verwendbar waren. In den Fällen Nr. 5, 6 und 7 (klin. Diagnose: Plasmocytom) wurden bei der Auszählung maximal 50% an Plasmazellen berücksichtigt, um die Aussagekraft dieser Versuche nicht zu beeinträchtigen.

Das Knochenmark folgender Patienten wurde in Versuch genommen:

1. H., E. 60 J.

Klin. Diagnose: Diabetes mellitus, PCP, toxisches Adenom, hypochrome Anämie.

Aus dem Blutbild vom 9. II. 1967

|                 |      |       |          |        |
|-----------------|------|-------|----------|--------|
| Ery.            | 3,49 | Mill. | Leuko.   | 10.600 |
| Hb              | 11,3 | g%    | Bas.     | -      |
| Hb <sub>E</sub> | 28,3 | pg    | Eos.     | 1%     |
| Hkt.            | 39,1 | %     | Mbl.     | -      |
|                 |      |       | Promy.   | -      |
|                 |      |       | Myel.    | -      |
|                 |      |       | Metam.   | 1,     |
|                 |      |       | Stäbe    | 8,     |
|                 |      |       | Serm.    | 75,    |
|                 |      |       | Lymphoc. | 11%    |
|                 |      |       | Monoc.   | 4,     |

Aus dem Originalknochenmarkausstrich vom 16. II. 1967

Die Granulopoese kommt in allen Reifestufen vermehrt vor, vorwiegend aber myelocytär. Die Erythropoese ist vermindert, sehr reif, keine Megaloblasten, wenig Mitosen.

Diagnose: Stark angeregtes Retikulum steht im Vordergrund.

Reifungskurve: Fig. 1.

2. Sch., E. 71 J.

Klin. Diagnose: Polycythämia vera, a. spin. ant. Syndrom.

Aus dem Blutbild vom 21. II. 1967

|                 |      |       |          |           |
|-----------------|------|-------|----------|-----------|
| Ery.            | 9,08 | Mill. | Leuko.   | 21.000    |
| Hb              | 24,0 | g%    | Bas.     | -         |
| Hb <sub>E</sub> | 26   | pg    | Eos.     | -         |
|                 |      |       | Mbl.     | -         |
|                 |      |       | Promy.   | -         |
|                 |      |       | Myel.    | -         |
|                 |      |       | Metam.   | -         |
|                 |      |       | Stäbe    | 6%        |
|                 |      |       | Serm     | 68%       |
|                 |      |       | Lymphoc. | 2%        |
|                 |      |       |          | Monoc. 4% |

Aus dem Originalknochenmarkausstrich vom 23. II. 1967:

Weiße Reihe in allen Reifestufen vertreten, Eosinophile nicht vermehrt. Rote Reihe in allen Reifestufen reichlich vertreten - in der Peroxydasefärbung gegenüber der weißen Reihe vermehrt. Sehr viel reife Erythroblasten, keine Megaloblasten. Megakaryocyten vermehrt.

Diagnose: Dringender Verdacht auf Polycythämie.

Reifungskurve: Fig. 2

3. D., P. 71 J.

Klin. Diagnose: Diabetes mellitus, ungeklärte normochrome Anämie.

Aus dem Blutbild vom 25. II. 1967

|                 |      |       |          |       |
|-----------------|------|-------|----------|-------|
| Ery.            | 3,13 | Mill. | Leuko.   | 7.700 |
| Hb.             | 10,1 | g%    | Bas.     | 2%    |
| Hb <sub>E</sub> | 32,2 | pg    | Eos.     | 2%    |
| Hkt.            | 31,0 | %     | Mbl.     | -     |
|                 |      |       | Promy.   | -     |
|                 |      |       | Myel.    | -     |
|                 |      |       | Metam.   | -     |
|                 |      |       | Stäbe    | 8%    |
|                 |      |       | Segm.    | 28%   |
|                 |      |       | Lymphoc. | 56%   |
|                 |      |       | Monoc.   | 3%    |
|                 |      |       | AMZ      | 1%    |

Aus dem Originalknochenmarkausstrich vom 13. II. 1967:

Weiße Reihe in allen Reifestufen vertreten, gut ausgereift. Rote Reihe in allen Reifestadien vermehrt, viele Mitosen, die reifen Erythroblasten überwiegen. Megakaryocyten vorhanden.

Diagnose: Kein auffälliges Mark.

Reifungskurve: Fig. 3

4. C., J. 67 J.

Klin. Diagnose: Chronische Pyelonephritis, Zustand nach Billroth

Aus dem Blutbild vom 25. IV. 1967

|                 |      |       |          |       |
|-----------------|------|-------|----------|-------|
| Ery.            | 4,29 | Mill. | Leuko.   | 5.300 |
| Hb.             | 13,5 | g%    | Bas.     | 2%    |
| Hb <sub>E</sub> | 32   | pg    | Eos.     | 5%    |
|                 |      |       | Mbl.     | -     |
|                 |      |       | Promy.   | -     |
|                 |      |       | Myel.    | -     |
|                 |      |       | Metam.   | -     |
|                 |      |       | Stäbe    | 1%    |
|                 |      |       | Segm.    | 35%   |
|                 |      |       | Lymphoc. | 50%   |
|                 |      |       | Monoc.   | 6%    |
|                 |      |       | AMZ      | 1%    |

Aus dem Originalknochenmarkausstrich vom 27. IV. 1967

Weiße Reihe in allen Reifestufen vermehrt, keine toxischen

Granulationen, Eosinophile nicht vermehrt.  
Rote Reihe in allen Reifestufen vorhanden, keine Megaloblasten,  
viele Mitosen. Megacaryocyten gut vertreten.

Diagnose: Kein pathologischer Befund.

Reifungskurve: Fig. 4

5. R., G. 68 J.

Klin. Diagnose: Plasmocytom, Nierencarcinom.

Aus dem Blutbild vom 19. VI. 1967

|                 |      |       |          |       |
|-----------------|------|-------|----------|-------|
| Ery.            | 4,19 | Mill. | Leuko.   | 8.500 |
| Hb.             | 12,0 | g%    | Bas.     | -     |
| Hb <sub>E</sub> | 29,0 | pg    | Eos.     | 1%    |
|                 |      |       | Mbl.     | -     |
|                 |      |       | Promy.   | -     |
|                 |      |       | Myel.    | -     |
|                 |      |       | Metam.   | -     |
|                 |      |       | Stäbe    | 3%    |
|                 |      |       | Serm.    | 51%   |
|                 |      |       | Lymphoc. | 54%   |
|                 |      |       | Monoc.   | 5%    |

Aus dem Originalknochenmarkausstrich vom 27. VI. 1967

Plasmazellen sehr zahlreich, mit zum Teil sehr grobem, aufre-  
lockertem Plasmasaum, auch viele nearkernige.  
Weiße Reihe in allen Reifestufen sehr gut vertreten, vorwiegend  
Eosinophile, hypersegmentierte.  
Rote Reihe in allen Reifestufen sehr gut vertreten, etwas  
linksverschoben, einzelne Megaloblastoide. Zahlreiche Mitosen,  
reichlich Megacaryocyten.

Diagnose: Dringender Verdacht auf beginnendes Plasmocytom.

Reifungskurve: Fig. 5

6. Sch., N. 60 J.

Klin. Diagnose: Plasmocytom.

Aus dem Blutbild vom 25. VII. 1967

|                 |      |       |          |       |
|-----------------|------|-------|----------|-------|
| Ery.            | 3,09 | Mill. | Leuko.   | 4.100 |
| Hb.             | 11,2 | g%    | Bas.     | 2%    |
| Hb <sub>E</sub> | 36   | pg    | Eos.     | -     |
|                 |      |       | Mbl.     | -     |
|                 |      |       | Promy.   | -     |
|                 |      |       | Myel.    | 2%    |
|                 |      |       | Metam.   | 2%    |
|                 |      |       | Stäbe    | 11%   |
|                 |      |       | Serm.    | 63%   |
|                 |      |       | Lymphoc. | 20%   |
|                 |      |       | Monoc.   | -     |

Aus dem Originalknochenmarkausstrich vom 25. VII. 1967

Massenhaft Plasmocytomzellen.  
Weiße Reihe in allen Reifestufen vorhanden, linksverschoben,  
deutlich zurückgedrängt, toxisch granuliert, Eosinophile vermehrt.

Rote Reihe in allen Reifestufen relativ gut vertreten, einzelne Makroblasten. Mitosen vorhanden. Megacaryocyten zum Teil nackt-kernig, deutlich vermindert.

Diagnose: Plasmocytom.

Reifungskurve: Fig. 6.

7. R., M. 74 J.

Klin. Diagnose: Normoeroteinämisches Plasmocytom.

Aus dem Blutbild vom 14. VIII. 1967

|                 |      |       |          |        |
|-----------------|------|-------|----------|--------|
| Ery.            | 5,38 | Mill. | Leuko.   | 10.200 |
| Hb              | 17,4 | g%    | Bas.     | 1%     |
| Hb <sub>E</sub> | 32,0 | pg    | Eos.     | 3%     |
|                 |      |       | Mbl.     | -      |
|                 |      |       | Promy.   | -      |
|                 |      |       | Myel.    | -      |
|                 |      |       | Metam.   | -      |
|                 |      |       | Stäbe    | 5%     |
|                 |      |       | Serm.    | 67%    |
|                 |      |       | Lymphoc. | 24%    |

Aus dem Originalknochenmarkausstrich vom 14. VIII. 1967

Weiße Reihe gegenüber dem Vorpunktat (Plasmocytomzellen) jetzt gut in allen Reifestufen vorhanden, auch nach der Peroxydase-reaktion noch etwas linksverschoben, keine toxische Granulation. Rote Reihe in allen Reifestufen gut vertreten, gegenüber dem Vorpunktat besser ausgereift, einzelne Makroblasten, viele Mitosen vorhanden.

Diagnose: Komplett e hämatologische Remission eines Plasmocytoms.

Reifungskurve: Fig. 7

8. H., A. 71 J.

Klin. Diagnose: Chronische Pyelonephritis mit Ausscheidungsinsuffizienz, chron. Leberparenchymschaden, Streptokokkeninfekt, rheumat. Arthritis, Anämie, Milztumor, Anämie.

Aus dem Blutbild vom 11. IX. 1967

|                 |      |       |          |        |
|-----------------|------|-------|----------|--------|
| Ery.            | 2,73 | Mill. | Leuko.   | 18.700 |
| Hb              | 8,1  | g%    | Eos.     | -      |
| Hb <sub>E</sub> | 29,8 | pg    | Bas.     | -      |
|                 |      |       | Mbl.     | -      |
|                 |      |       | Promy.   | 1%     |
|                 |      |       | Myel.    | 1%     |
|                 |      |       | Metam.   | -      |
|                 |      |       | Stäbe    | 9%     |
|                 |      |       | Serm.    | 76%    |
|                 |      |       | Lymphoc. | 12%    |

Aus dem Originalknochenmarkausstrich vom 11. IX. 1967

Weiße Reihe in allen Reifestufen vertreten, etwas linksverschoben. Toxische Granulationen.

Rote Reihe gegenüber der weißen zurückgedrängt, keine Megaloblasten, Megacaryocyten gut vertreten, auch viele Megacaryoblasten. Rath u. Finch IV.

Diagnose: Zeichen der hochgradigen Entzündung und sideroachrestischen Anämie.

Reifungskurve: Fig. 8.

9. B., V. 47 J.

Klin. Diagnose: Sepsis ohne Leukocytose, Infektanämie.

Aus dem Blutbild vom 3. X. 1967

|                 |      |       |          |       |
|-----------------|------|-------|----------|-------|
| Ery.            | 3,24 | Mill. | Leuko.   | 4.150 |
| Hb.             | 11,4 | g%    | Bas.     | 1%    |
| Hb <sub>E</sub> | 35   | pg    | Eos.     | 7%    |
|                 |      |       | Mbl.     | -     |
|                 |      |       | Promy.   | -     |
|                 |      |       | Myel.    | -     |
|                 |      |       | Metam.   | -     |
|                 |      |       | Stäbe    | 3%    |
|                 |      |       | Segm.    | 64%   |
|                 |      |       | Lymphoc. | 19%   |
|                 |      |       | Monoc.   | 6%    |

Aus dem Originalknochenmarkausstrich vom 3. X. 1967

Weißreihe in allen Reifestufen sehr gut vertreten, gut ausgereift. Toxische Granulationen, reichlich Eosinophile und Monocyten. Peroxydase stark positiv.

Rote Reihe in allen Reifestufen vertreten, im Verhältnis zur weißen Reihe deutlich vermindert, etwas linksverschoben.

Keine Megaloblasten, Mitosen vorhanden, Megacaryocyten sehr zahlreich, z.T. nacktkernig.

Diagnose: Die Vermehrung der Monocyten könnte im Sinne einer beginnenden Erschöpfung der Granulopoese oder eines Virusinfektes gedeutet werden.

Reifungskurve: Fig. 9.

10. W., W. 74 J.

Klin. Diagnose: Blutungsanämie unklarer Genese.

Aus dem Blutbild vom 20. X. 1967

|                 |      |       |          |       |
|-----------------|------|-------|----------|-------|
| Ery.            | 4,04 | Mill. | Leuko.   | 7.800 |
| Hb.             | 13,0 | g%    | Bas.     | -     |
| Hb <sub>E</sub> | 34   | pg    | Eos.     | 2%    |
|                 |      |       | Mbl.     | -     |
|                 |      |       | Promy.   | -     |
|                 |      |       | Myel.    | -     |
|                 |      |       | Metam.   | -     |
|                 |      |       | Stäbe    | 2%    |
|                 |      |       | Segm.    | 78%   |
|                 |      |       | Lymphoc. | 18%   |

Aus dem Originalknochenmarkausstrich vom 27. X. 1967

Weiße Reihe in allen Reifestufen gut vertreten, viele Myeloblasten, keine toxisch Granulierten, wenig Eosinophile, zahlreiche Monocyten, Peroxydase stark positiv, G/E gegen 1 verschoben.

Rote Reihe in allen Reifestufen sehr gut vertreten, etwas linksverschoben, keine Megaloblasten, Mitosen zahlreich in beiden Reihen. Megakaryocyten zahlreich.

Diagnose: Stark angeregte Erythropoese wie bei Hämolyse oder Blutung.

Reifungskurve: Fig. 10.

beim Vergleich der einzelnen Reifungskurven ergeben sich unregelmäßige, teilweise erhebliche Abweichungen im Verlauf sowohl der Kontrollen untereinander, als auch zwischen Versuch und zugehöriger Kontrolle.

Diese sind auf die verschiedenen pathologischen Zustände der Ausgangspunkte und andere schwer objektivierbare Einflüsse auf die sehr empfindlichen Zellkulturen zurückzuführen. Daher verzichteten wir auf die weitere Betrachtung der Einzelversuche und ermittelten für beide DMSO-konzentrationen und die zugehörigen Kontrollen die durchschnittlichen Reifungskurven durch Berechnung des arithmetischen Mittelwertes der jeweils entsprechenden Einzelwerte. Ebenso wurde mit den G/E-werten und den Mitoseindices verfahren. ( Fig. 12 u. 13 ) Bei deutlicher Abweichung dieser Kurven in Versuch und Kontrolle wurde mit Hilfe des Studenttestes errechnet, wie hoch die jeweilige Zufallsbelastung dieser Abweichung war. Wenn sich eine Wahrscheinlichkeit von weniger als 5% für ein zufälliges Ergebnis herausstellte, sahen wir die Abweichung als durch den Zusatz bedingt an. ( 25, 26 )

Dabei ergibt sich:

#### 1. Für die Erythropoese:

Bei 24<sup>h</sup> ist die prozentuale Verteilung der einzelnen Reifungsstufen, wie aus den Abbildungen 12 und 13 ersichtlich, für die Versuchsreihen mit 1% und 5% DMSO-zusatz gegenüber den Kontrollen kaum verändert.

Der mittlere G/E sinkt von 1,83 auf 1,24 bzw. von 2,18 auf 1,66 ab.

Der mittlere rMI steigt bei 1% DMSO von 13,6‰ auf 18,5‰, bei 5% DMSO sinkt er von 12,8‰ auf 9,21‰ ab.

Dies wird durch einen Versuch (Nr. 9) bewirkt. Hier ist rMI in der Kontrolle 19,6‰, bei 1% DMSO 45,0‰, bei 5% DMSO aber 0,0‰. Bei der geringen Anzahl der Einzelversuche (n=5 für die höhere Konzentration) bewirkt dieser eine Wert die oben angegebene Verminderung.

Die Abweichung des rMI im Versuch mit 1% DMSO ist nicht signifikant;  $t=1,282$  statt  $2,262$  für eine Zufallsrate von 5%.

Bei 48<sup>h</sup> findet sich eine Linksverschiebung der Reifungskurve bei 1% und 5% DMSO, im ersten Fall bedingt durch die Verminderung der basophilen Erythroblasten von 6,5% auf 4,7% und der polychromatischen Ebl. von 22,7% auf 15,1%. Der Studententest ergibt für n=10 und p=0,05 statt  $t=2,262$  nur  $t=2,127$ , also keine signifikante Abweichung.

Da beim Versuch mit 5% DMSO die Abweichung geringer und die Zahl der Einzelwerte geringer ist (n=5), ergibt sich mit Sicherheit keine signifikante Veränderung, auf die Berechnung wurde deshalb verzichtet.

Der G/E-Index ist bei 1% DMSO von 1,85 auf 1,64 vermindert, bei 5% von 1,65 auf 2,44 erhöht, der rMI bei 1% von 7,2‰ auf 10,3‰ leicht vergrößert, bei 5% DMSO unverändert 7,8‰.

Bei 72<sup>h</sup> zeigen die Versuchsreihen mit beiden Konzentrationen ebenfalls linksverschobene Reifungskurven. Die Fehlerrechnung zeigt bei den am meisten abweichenden polychromatischen Ebl. bei 1% DMSO keine Signifikanz ( $t$  für n=8 und p=0,05 statt 2,306 nur 2,027).

Für 5% wurde aus den selben Gründen wie oben auf eine Berechnung verzichtet.

Der mittlere rMI steigt unter 1% DMSO von 1,2% auf 3,2% an, unter 5% DMSO finden sich ebenso wie in den entsprechenden Kontrollen keine Mitosen mehr. Der mittlere G/E-index sinkt von 3,14 auf 2,42 bzw. von 3,24 auf 2,10 ab.

## 2. Für die Granulopoese:

Für die Versuchsreihe mit 1% DMSO ergibt sich bei 24<sup>h</sup> wie bei der Erythropoese keine wesentliche Abweichung im Verlauf der Reifungskurve. Der rMI ist mit 13,2 % gegenüber 12,2 % in der Kontrolle nur geringfügig erhöht.

Bei 48<sup>h</sup> findet sich eine statistisch nicht signifikante Linksverschiebung der Reifungskurve, die teilungsfähigen Zellen sind von 68,2% in der Kontrolle auf 57,5% bei 1%DMSO vermindert. (  $t=1,428$  statt 2,262 für  $n=10$  u.  $p=0,05$  ).

Der rMI steigt wie bei 24<sup>h</sup> geringfügig von 8,6% auf 10,0% an.

Bei der Versuchsreihe mit 5% DMSO ist der rMI etwas mehr als bei 1% DMSO angestiegen, nach 24<sup>h</sup> von 13,5% auf 16,0%, nach 48<sup>h</sup> von 8,3% auf 11,1%.

Die Teilungsfähigen Zellen sind bei beiden Bebrütungszeiten nicht signifikant vermindert.

Nach 72<sup>h</sup> zeigt sich für beide Versuchsreihen eine Umkehrung dieser Tendenz: Während jetzt in den Kontrollen eine deutliche Linksverschiebung der Reifungskurven zu erkennen ist, bleibt unter DMSO der Anteil der einzelnen Reifungsstufen gegenüber den 48<sup>h</sup>-Kulturen fast unverändert: Die teilungsfähigen Zellen nehmen gegenüber den 48<sup>h</sup>-Kulturen nur von 57% auf 52% bzw. von 49% auf 47% ab.

Dabei sind die rMI deutlich höher als in den Kontrollen:  
6,7% : 4,2% bzw. 4,1% : 1,3% .

Insgesamt wurden bei den 10 Patienten in den Versuchen und Kontrollen 368 Mitosen gezählt, im Durchschnitt 37 pro Patient. Wegen dieser geringen Anzahl wurde ebenfalls auf Einzeldarstellungen in karyologischen Kurven verzichtet. In der Gesamtdarstellung (Fig. 11) zeigt sich eindeutig, daß keine Veränderung der relativen Dauer der einzelnen Mitosephasen unter 1% und 5% DMSO auftritt.

Diese Ergebnisse wurden unter der Annahme gewonnen, daß das Knochenmark der einzelnen Patienten, unabhängig von der vorliegenden Erkrankung, unter DMSO jeweils gleichsinnige Veränderungen zeigt. Dementsprechend stellt sich die Frage, ob sich Wirkungen der Zusätze in Beziehung zum Zustand des Knochenmarkes, soweit er aus dem peripheren Blutbild und der morphologischen Beurteilung des entsprechenden Originalknochenmarkausstriches erkennbar ist, ermitteln lassen.

Dabei findet man in der ersten Versuchsreihe mit 1% DMSO (10 Einzelversuche) bei der Betrachtung der Erythropoese folgendes:

Bei vier Fällen (Nr. 1, 3, 8 und 9) läßt sich eine Linksverschiebung der Reifungskurven durch die Zusätze erkennen.

Bei drei Fällen (Nr. 5, 7 und 10) bewirken die Zusätze eher eine Rechtsverschiebung.

Bei den Fällen Nr. 2, 4 und 6 ist die Wirkung gering oder in der Tendenz uneinheitlich.

Für jede dieser drei Gruppen wurden wieder die durchschnittlichen Reifungskurven, rMI, G/E-Index errechnet. (Fig. 14 a, b, c): Die zweite Versuchsreihe mit 5% DMSO mußte wegen der geringen Anzahl der Einzelversuche (5 Fälle) unberücksichtigt bleiben.

Dabei ergibt sich für die erste Gruppe (14 a.):

24<sup>h</sup>: G/E von 2,16 auf 1,52 gesenkt, rMI ist von 13,5% auf 26,7% deutlich, aber nicht signifikant gesteigert, eine statistisch gesicherte Linksverschiebung der Reifungskurve (Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5%).

48<sup>h</sup>: G/E sinkt von 2,10 auf 1,92, rMI ist von 6,56% auf 12,4% nicht signifikant gesteigert, die Reifungskurve ist signifikant nach links verschoben. ( $t=3,188$  statt  $3,182$  f.n=4 u.p=0,05)

72<sup>h</sup>: G/E steigt von 2,40 auf 2,90, es finden sich keine Mitosen in Versuch und Kontrolle, die Reifungskurven haben sich weitgehend angenähert.

In der zweiten Gruppe (14 b.):

24<sup>h</sup>: G/E sinkt von 2,03 auf 1,02 ab, rMI bleibt gleich (12,8% zu 12,7%), die Reifungskurve zeigt im Gegensatz zur ersten Gruppe eine starke Rechtsverschiebung: Die teilungsfähigen

Erythroblasten sind von 19,4% auf 48,3% stark, aber nicht signifikant gesteigert.

48<sup>h</sup>:G/E sinkt von 2,20 auf 1,79, rMI fällt von 8,4% auf 5,02% die Reifungskurven sind weitgehend angenähert.

72<sup>h</sup>:G/E von 3,00 auf 1,80 gesenkt, keine Mitosen in Versuch und Kontrollen, die Reifungskurve ist unter DMSO etwas nach links verschoben.

In der dritten Gruppe (14 c):

24<sup>h</sup>:G/E, rMI und die Reifungskurven sind kaum verändert.

48<sup>h</sup>:G/E steigt von 1,09 auf 1,63, rMI steigt von 7,1% auf 12,9% an, die Reifungskurve ändert sich ebenfalls kaum.

72<sup>h</sup>:G/E sinkt von 2,44 auf 2,14 ab, rMI zeigt nur im Versuch noch eine Mitosetätigkeit (4,1%), die Reifungskurve ist nach links verschoben.

Vergleicht man die klinischen Diagnosen einschließlich der Knochenmarkdiagnosen und der peripheren Blutbilder so findet man:

In der ersten Gruppe (Fälle Nr. 1, 3, 8 und 9) vier Patienten mit einer entzündlich bedingten Anämie, dabei dreimal die Diagnose: Deutlich zurückgedrängte rote Reihe, G/E im Durchschnitt 4,6.

In der zweiten Gruppe (Fall Nr. 5, 7 und 10) zwei Plasmocytomfälle, ein Fall von Blutungsanämie, dabei dreimal die Diagnose: Rote Reihe gut vertreten, Mitosen zahlreich. G/E im Durchschnitt 1,77.

In der dritten Gruppe ein Fall von Polycythämia vera (unbehandelt) ein Plasmocytomfall mit Anämie, ein Fall von Pyelonephritis mit normalem roten Blutbild. Dabei zweimal kein auffälliger Befund in der roten Reihe. G/E im Durchschnitt 2,77.

Für die weiße Reihe konnten wir keine unterschiedliche Wirkung von DMSO auf die verschiedenen Kulturen finden.

### Interpretation:

Für die rote Reihe ergibt sich bei Zusammenstellung aller Einzelergebnisse in beiden Versuchsreihen eine geringfügige, statistisch nicht gesicherte Reifungsbeschleunigung nach 48<sup>h</sup> und 72<sup>h</sup> Bebrütungsdauer.

Die Steigerung der Mitoserate im Versuch mit 1% DMSO bei 24, 48 und 72 Stunden weist auf eine Steigerung der Regeneration hin, die Abweichung ist ebenfalls nicht signifikant. Bei 5% DMSO ist keine deutliche Abweichung der Mitoseindices zu erkennen.

Bei der Zuordnung der Einzelversuche zu Gruppen mit verschiedenen Funktionszuständen des roten Knochenmarkes zeigt sich:

In der ersten Gruppe mit vier Fällen von entzündlich bedingter Anämie (Fig. 14 a) weist der bei 24<sup>h</sup> und 48<sup>h</sup> stark erhöhte rMI, der gegenüber den Kontrollen verminderte G/E und das signifikant reifere Zellbild auf

1. Eine verzögerte Entkernung, vermutlich durch eine Störung der Kernreifung bedingt und
2. Eine verstärkte Proliferation, d.h. eine verstärkte Neubildung von Zellen durch Mitosevorgänge und beschleunigte Ausreifung

hin.

Bei 72<sup>h</sup> haben sich die Verhältnisse weitgehend wieder angenähert, so daß der Zusatz nur vorübergehend wirksam zu sein scheint.

In der zweiten Gruppe (Fig. 14 b) mit im Original gut vertretener roter Reihe und erniedrigtem G/E-Index läßt bei 24<sup>h</sup> das starke Hervortreten unreifer Erythroblasten auf eine Verzögerung der in den Kontrollen sehr raschen Ausreifung durch DMSO schließen. Die Regeneration ist unverändert.

Bei 48<sup>h</sup> und bei 72<sup>h</sup> finden sich nur relativ geringe Unterschiede. Die Regeneration ist im Gegensatz zur ersten Gruppe eher vermindert.

In der dritten Gruppe (Fig. 14 c) ist bei 24<sup>h</sup> keine Wirkung zu bemerken. Nach 48<sup>h</sup> bewirkt DMSO nur eine geringfügige Steigerung der Proliferation.

Für die weiße Reihe findet man unter 1% DMSO in der ersten Versuchsreihe bei 48<sup>h</sup> und unter 5% DMSO in der zweiten bei 24 und 48<sup>h</sup> eine leichte Reifungsbeschleunigung gegenüber den Kontrollen, die in keinem Fall signifikant wird. Die Regeneration ist bei beiden Konzentrationen zu allen Bebrütungszeiten gesteigert, wie aus dem erhöhten weißen Mitoseindex bei unveränderter karyologischer Kurve hervorgeht.

Bei 72<sup>h</sup> Bebrütungsdauer nimmt unter DMSO der prozentuale Anteil unreifer Zellen zu, dies kann man als Folge eines durch toxische Wirkung der Zusätze aufgetretenen Zerfalls der reifen Granulocyten deuten.

Der relativ verstärkte Anstieg des wMI unter DMSO bei zunehmender Bebrütungsdauer spricht für eine die Regeneration steigernde Wirkung sowohl von 1% als auch 5% DMSO. Auch das könnte zur fehlenden Ausreifung bei 72<sup>h</sup> beitragen.

## Diskussion

DMSO ist als geeigneter Schutzstoff für die Konservierung lebender Knochenmarkszellen bekannt geworden.

( Lovelock, Bishop, Ashwood-Smith, Pyle, Boyer, Cavins, Djerassi, Farrant, Bouroncle u.a. )

Da weiterhin Einflüsse dieser Substanz auf die Funktion verschiedener Zellorganellen, auf enzymatische Vorgänge in lebenden Zellen und andere biologische Vorgänge nachgewiesen wurden, ( Muset, Rammler, Zaffaroni, Herskovits, Laskovsky, Heimkamp, Ts'o, Misch, Altland, Wacker, Mohrbutter, Berliner, Ruhmann, Chang, Simon, Richards, Persitzky u.a. ) sind Auswirkungen von DMSO auf die Kinetik des menschlichen Knochenmarkes denkbar. Mit der angewendeten einfachen in-vitro-Methode und Auswertung der Kulturergebnisse durch Differentialzellzählung sollten diese Auswirkungen beurteilt werden. Entsprechende Untersuchungen konnten wir in der Literatur nicht finden.

Die dabei gefundene leichte Förderung der Regeneration und Reifung war für die Granulopoese weder bei 24<sup>h</sup> noch bei 48<sup>h</sup> Bebrütungsdauer statistisch signifikant. Da bei beiden Bebrütungszeiten und beiden im Versuch verwendeten DMSO-Konzentrationen gleichsinnige Veränderungen auftraten, erscheint es uns dennoch gerechtfertigt, hier eine gewisse Wirkung des DMSO zu vermuten. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Auswertung von Knochenmarkkulturen immer mit einem Unsicherheitsfaktor belastet ist. Deshalb sind statistisch signifikante Ergebnisse bei weniger starken Auswirkungen von Zusätzen u.U. erst bei sehr viel größeren Kollektiven zu erwarten.

Toxizitätsuntersuchungen von Schreck ( 24 ) besagen, daß DMSO in 2%iger Konzentration bei 24<sup>h</sup> Bebrütungsdauer in einer Temperatur von 37° C erheblich toxisch für Granulocyten sei und ab 4%iger Konzentration bereits zum Absterben aller Leukocyten führe. Dafür fanden wir in unseren Ergebnissen keinen Anhalt, wobei wir bei der angewendeten Methode allerdings keine Möglichkeit hatten, die absoluten Zellzahlen zu verfolgen. Morphologisch fand sich aber keine Vermehrung degenerativer Veränderungen gegenüber den Kontrollen.

Unter unseren Versuchsbedingungen wirkt sogar 5% DMSO weder auf Leukocyten noch auf die granulopoetischen Vorstufen letal.

In einer anderen Arbeit schreibt Bouroncle ( 19 ), daß 12,5% DMSO schon nach einer Expositionsdauer von 15 bis 120 min. deutlich toxischer für die reifen Granulocyten als für die unreifen Vorstufen ist. Dieser Befund läßt sich vielleicht in Beziehung bringen zu der in unseren Versuchen zu beobachtenden relativen Verminderung der reifen Granulocyten bei 72<sup>h</sup>, die sowohl unter 1% als auch 5% DMSO auftritt.

In der caryologischen Kurve finden sich bei beiden DMSO-konzentrationen keine Veränderungen, ebenso ist die Zellteilungsrate unter DMSO eher größer, sodaß sich kein Anhalt für eine Beeinträchtigung der Mitose-tätigkeit ergibt.

Die aus der Zusammenstellung der Einzelergebnisse für die Erythropoese erhaltenen Resultate sind ebenfalls statistisch nicht signifikant. Die unter beiden Konzentrationen des Zusatzes zu beobachtende Zunahme der reifen Erythroblasten ab 48<sup>h</sup> entspricht etwa der bei der weißen Reihe aufgetretenen Reifungsbeschleunigung.

Teilt man die 10 unter 1% DMSO untersuchten Fälle nach dem Ergebnis der Knochenmarkpunktion (Originalausstrich) und nach der klinischen Diagnose in drei Gruppen ein, so findet man für die Erythropoese drei gegensinnige Reaktionstypen. In der ersten Gruppe ergeben sich jetzt sogar bei der geringen Anzahl von nur vier Fällen statistisch signifikante Abweichungen der Reifungskurve bei 24<sup>h</sup> und 48<sup>h</sup>. In den beiden anderen Gruppen mit je drei Fällen sind die Abweichungen zum Teil erheblich, aber nicht signifikant. Da der Funktionszustand des erythropoetischen Knochenmarkes mit diesen Reaktionstypen korreliert, meinen wir daß es sich hierbei nicht um einen Zufall handelt, obwohl sich die gegenteilige DMSO-wirkung im Gesamtergebnis weitgehend wieder aufhebt.

Eine Entscheidung kann hier nur durch weitere Untersuchungen an einem erheblich größeren Patientenmaterial getroffen werden.

Dabei wäre zum Beispiel denkbar, daß humorale, im Patientenserum vorhandene Faktoren durch die DMSO-wirkung besser in

die roten Knochenmarkzellen gelangten und deshalb verstärkt wirksam werden könnten.

### Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand menschlicher Knochenmarkkulturen und deren Auswertung durch Differentialzellzählung untersucht, ob DMSO in den für die Knochenmarkkonservierung üblichen Konzentrationen ( 1% bzw. 5% DMSO ) einen Einfluß auf die Proliferation des granulopoetischen oder erythropoetischen Systems hat.

Dabei ergab sich in der weißen Reihe kein statistisch signifikanter Unterschied in Versuch und Kontrolle, insgesamt ließen die Ergebnisse eine leichte Förderung der Regeneration und Reifung vermuten.

Auf die Erythropoese wirkte sich DMSO verschieden aus, abhängig vom Funktionszustand des Knochenmarkes zum Zeitpunkt der Entnahme vom Patienten. Insgesamt hoben sich diese zum Teil statistisch signifikanten Einflüsse jedoch weitgehend wieder auf, sodaß die Entscheidung, ob hier ein Zufall vorliegt, nicht gefällt werden konnte.

Ein Anhalt für eine toxische Wirkung des DMSO in den verwendeten Konzentrationen fand sich nicht.

## Literaturverzeichnis:

1. Alexander Saytzeff

Über die Einwirkung von Salpetersäure auf Schwefeldimethyl  
und Schwefeläthyl.

Ann. Chem. (Liebig) 144:148 (1867)

2. Leake, Ch. D.

Einiges zur Vorgeschichte von DMSO

aus: Dimethylsulfoxid - DMSO

Internationales Symposium am 8./9. Nov. 1966 in Wien

Hrsg.: Dr. G. Laudahn und Dr. K. Gertrich, Berlin 1966, S. 1-5

3. Lovelock, J.E. u. Bishop, M.W.H.

Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl-  
sulfoxide.

Nature 183, 4672:1934 (1959)

4. Jacob, S.W.; Bischel, M.D. u. Herschler, R.J.

Dimethylsulfoxide: Effects on permeability of biological  
membranes: Preliminary report.

Curr. Ther. Res. 6:193 (1964)

5. Jacob, S.W.; Bischel, M.D. u. Herschler, R.J.

Dimethylsulfoxide (DMSO): New concept in pharmacotherapy.

Curr. Ther. Res. 6:134 (1964)

6. Muset, P.P. u. Martin-Esteve, J.

Physiological cell permeability and pharmacological action  
of DMSO.

Experientia 21, 11:649 (1965)

7. Arnold, M.

Die Membranen der Zellen.

Arch. Pharm. 299, 8. Mitt. Dtsch. Pharm. Ges. DDR, 36, 8:161  
(1966)

8. Rammner, D.H. u. Zaffaroni, A.

Biological implications of DMSO based on review of its  
chemical properties.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 141, 1:13 (1967)

9. Helmkamp, G.K. u. Ts'o, P.O.P.

The secondary structure of nucleic acids in organic solvents.  
J.Am.Chem.Soc. 83:138 (1961)

10. Kuschinsky, G.

in DMW v. 5. 11. 1965 (zit. n. Selecta 48 v. 29. 11. 1965  
S. 2066)

11. Misch, D.W.

The penetration of lysosomes by DMSO.  
J.Cell.Biol. 27:67 A (1965)

12. Altland, P.D. u. Highman, U.B.

Effects of dimethylsulfoxide on serum enzymes and tissues  
in exercised rats.  
Life Sci. 5, 4:375 (1966)

13. Wacker, A. u. Mohrbutter, K.P.

Einfluß von Dimethylsulfoxid auf die zellfreie Proteinsynthese.  
Naturwiss. 54, 4:90 (1967)

14. Berliner, D.L. u. Ruhmann, A.G.

The influence of dimethylsulfoxide on fibroblastic proliferation.  
Ann.N.Y.Acad.Sci. 141, 1:159 (1967)

15. Chang, C. u. Simon, E.

The effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on cellular systems.  
Proc.Soc.exp.Biol. 128 1:60 (1968)

16. Malinin, T. u. Perry, H.

Toxicity of dimethylsulfoxide (DMSO) on He-LA cells.  
Cryobiology 4:90 (1967)

17. Persidsky, M. u. Richards, W.

Toxicity of DMSO against bone-marrow of the rat.  
Nature 197, 1010 (1963)

18. Schrek, R.

Effects of heat and dimethylsulfoxide on normal and leucemic lymphocytes.  
Lancet 7420:1020 (1965 II)

19. Bouroncle, B.A.

Preservation of human normal and leucemic cells with dimethylsulfoxide.

Cryobiology 3, 6:445 (1967)

20. Calvo, W.

Nervous regulatory mechanism in adeption haematology.

(Euratom Contact Group Meeting) Hinterzarten 1966

21. Teir, H.T. u. Rytömaa, T.

A feedback regulation system of granulocytopoiesis.

Sangre 9, 418, (1964)

22. Boll, I.

Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik Bd. 17,

Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York 1966.

23. Heckner, F.

Leitfaden der Blutzellkunde.

Verlag Urban und Schwarzenberg, München - Berlin - Wien , 1965.

24. Schrek, R.

Cytocidal effect of dimethylsulfoxide on normal and leucemic lymphocytes.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 141, 1:202 (1967)

25. Lindner, A.

Statistische Methoden

Birkhäuser-Verlag, Basel 1960.

26. Lindner, A.

Handliche Sammlung math.-stat. Tafeln.

Birkhäuser-Verlag, Basel 1961.

Erläuterungen zu Fig. 1 bis 10 und 12 bis 14:

Fig. 1 bis 10 sind die Reifungskurven der zehn bearbeiteten Fälle. Fig. 12 stellt die mittlere Reifungskurve der Fälle Nr. 1 bis 10 unter 1% DMSO-Zusatz und der zugehörigen Kontrollen dar, Fig. 13 die mittlere Reifungskurve der Ansätze mit 5% DMSO und der Kontrollen. (Fälle Nr. 5 bis Nr. 9)

In Fig. 14 a, b und c sind die durchschnittlichen Reifungskurven der Erythropoese unter 1% DMSO-Zusatz und unter Kontrollbedingungen bei drei Gruppen von Patienten dargestellt; die Erläuterungen zu dieser Einteilung werden auf S. 17 und 18 gegeben. Fig. 14 a umfaßt die Fälle Nr. 1, 3, 8 und 9; Fig. 14 b die Fälle Nr. 5, 7 und 10; Fig. 14 c die Fälle Nr. 2, 4 und 6.

In Fig. 1 bis 10, 12 und 13 ist jeweils auf der linken Seite die Reifungskurve der Erythropoese, rechts die der Granulopoese dargestellt, wobei Versuch und Kontrollen durch verschiedene Strichsymbole unterschieden werden. (Siehe Bildunterschriften)

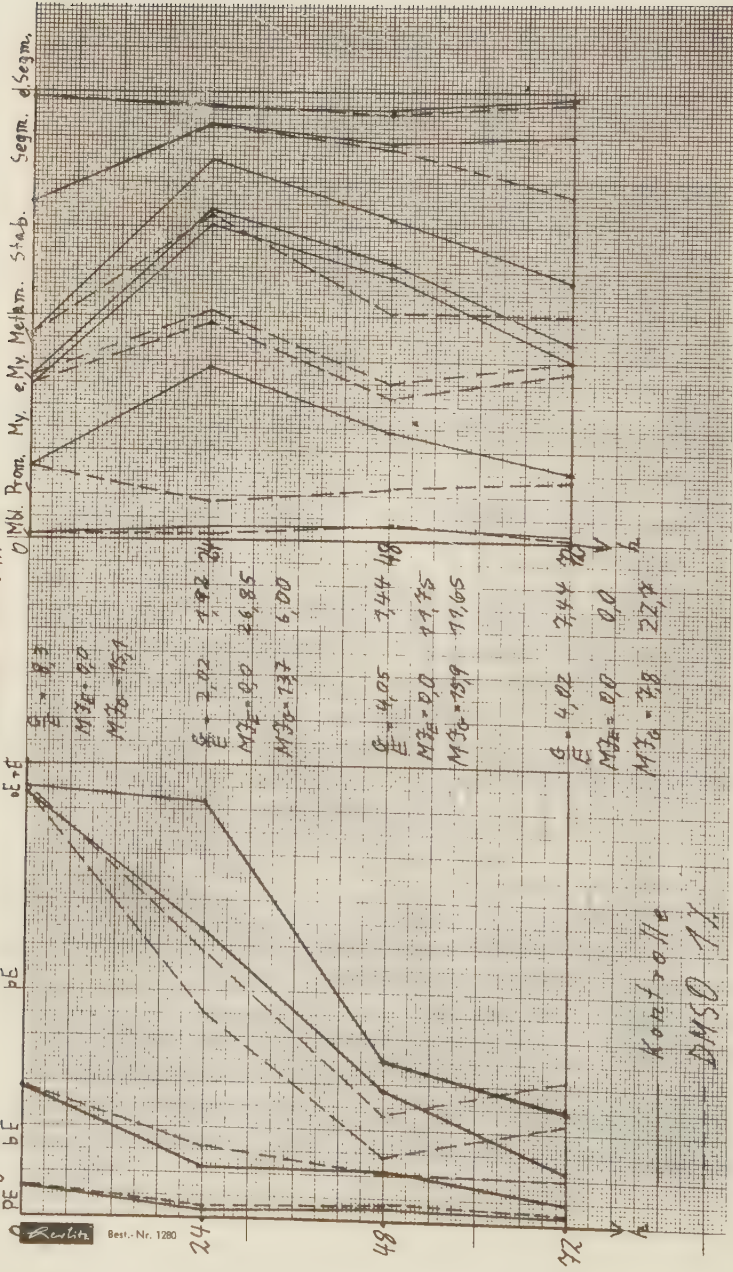
In der Waagerechten ist der prozentuale Anteil der einzelnen Reifestufen ( bei der Erythropoese: PE = Proerythroblast, bE = basophiler Erythroblast, pE = polychromatischer Erythroblast, oE = oxyphiler Erythroblast, rE = reifer Erythroblast; bei der Granulopoese: Mbl. = Myeloblast, Prom. = Promyelocyt, My. = Myelocyt, e.My. = eosinophiler Myelocyt, Metam. = Metamyelocyt, Stab. = stabkerniger M., Segm. = segmentkerniger Myelocyt, e.Segm. = eos. Segmentkerniger ) an der Gesamtheit der Zellen der Granulopoese bzw. Erythropoese so dargestellt, daß jeweils 1% = 1 mm entspricht.

Senkrecht dazu sind die Bebrütungszeiten in Stunden aufgetragen, nach denen aus den Kulturen Ausstriche angefertigt und differenziert wurden, wodurch die Verschiebung der Anteile der einzelnen Reifestufen deutlich wird. Bei  $O^h$  sind die Ausgangswerte in den Originalpräparaten dargestellt.

Zwischen den Zeichnungen sind der G/E Index, d.h. das Verhältnis der gezählten weißen und roten Zellen, der rote Mitoseindex  $MI_E$  und der weiße Mitoseindex  $MI_G$  aufgetragen, bei  $O^h$  für das Ausgangspräparat, bei den einzelnen Bebrütungszeiten links für die Kontrollen, rechts für die Versuchskulturen.

Fig. 1

Kontrolle DMSO 1%



Kontrolle  
DMSO 1%



Fig. 3

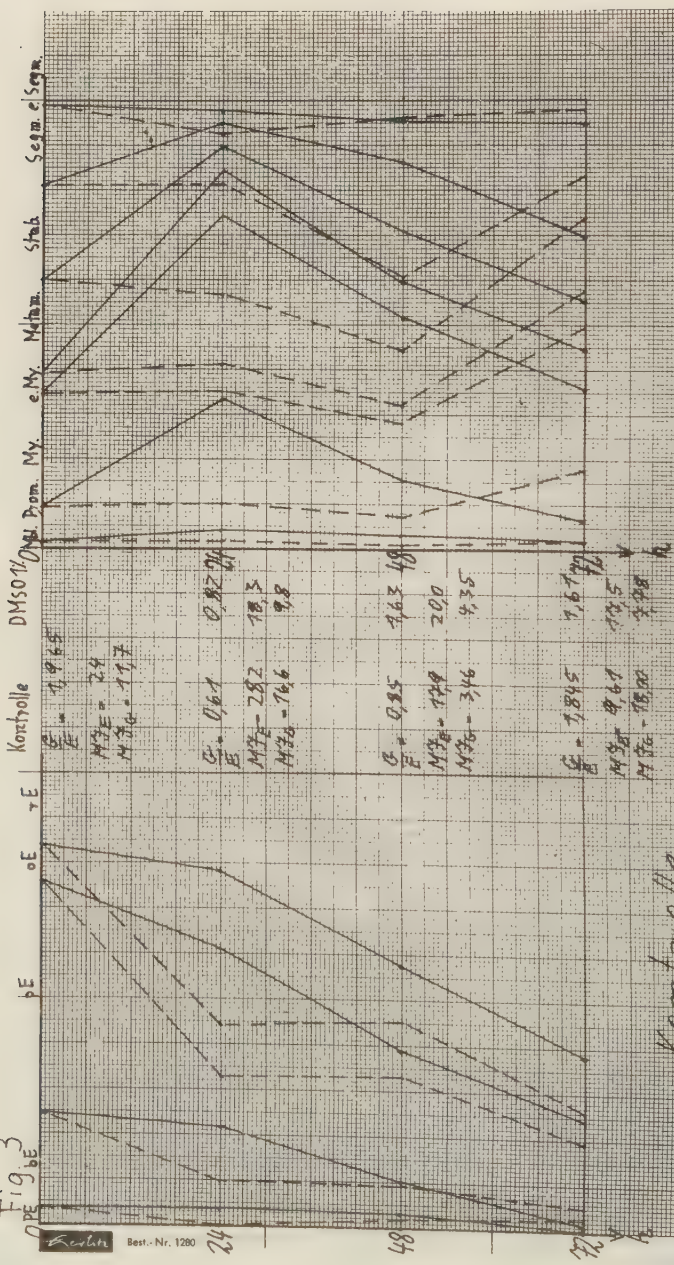


Fig. 2

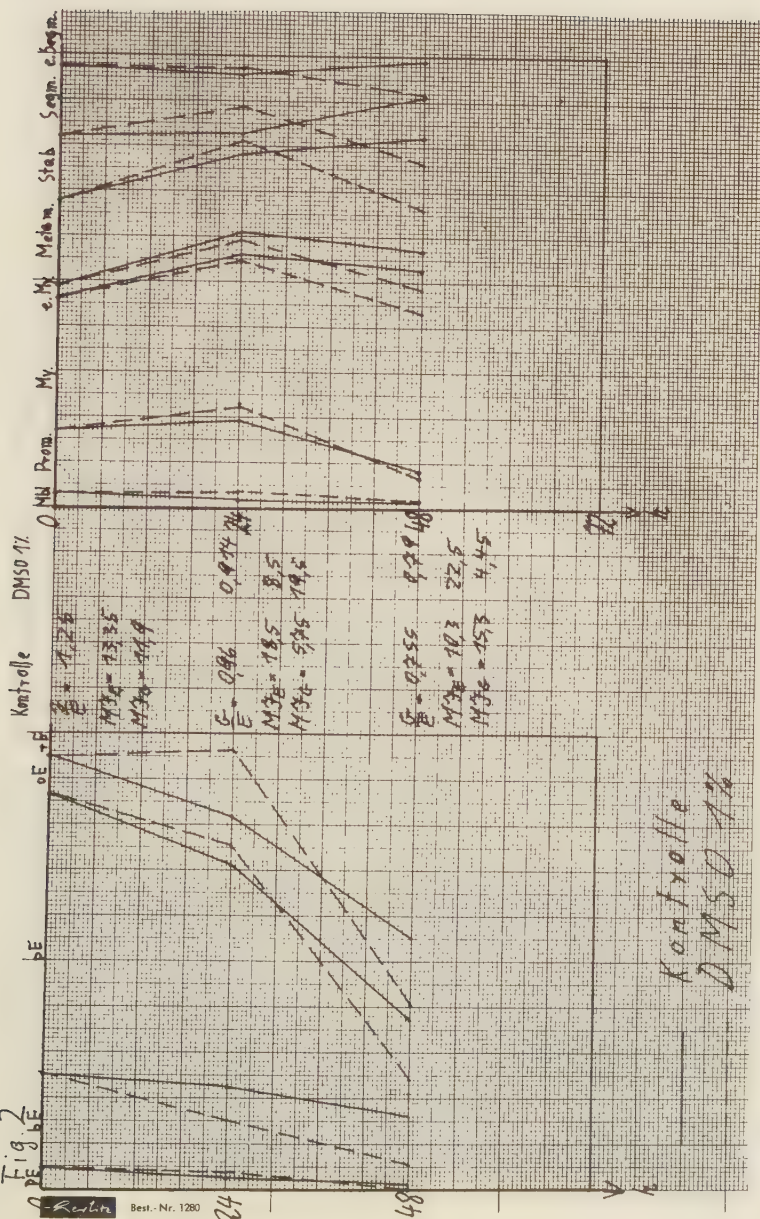


Fig. 3

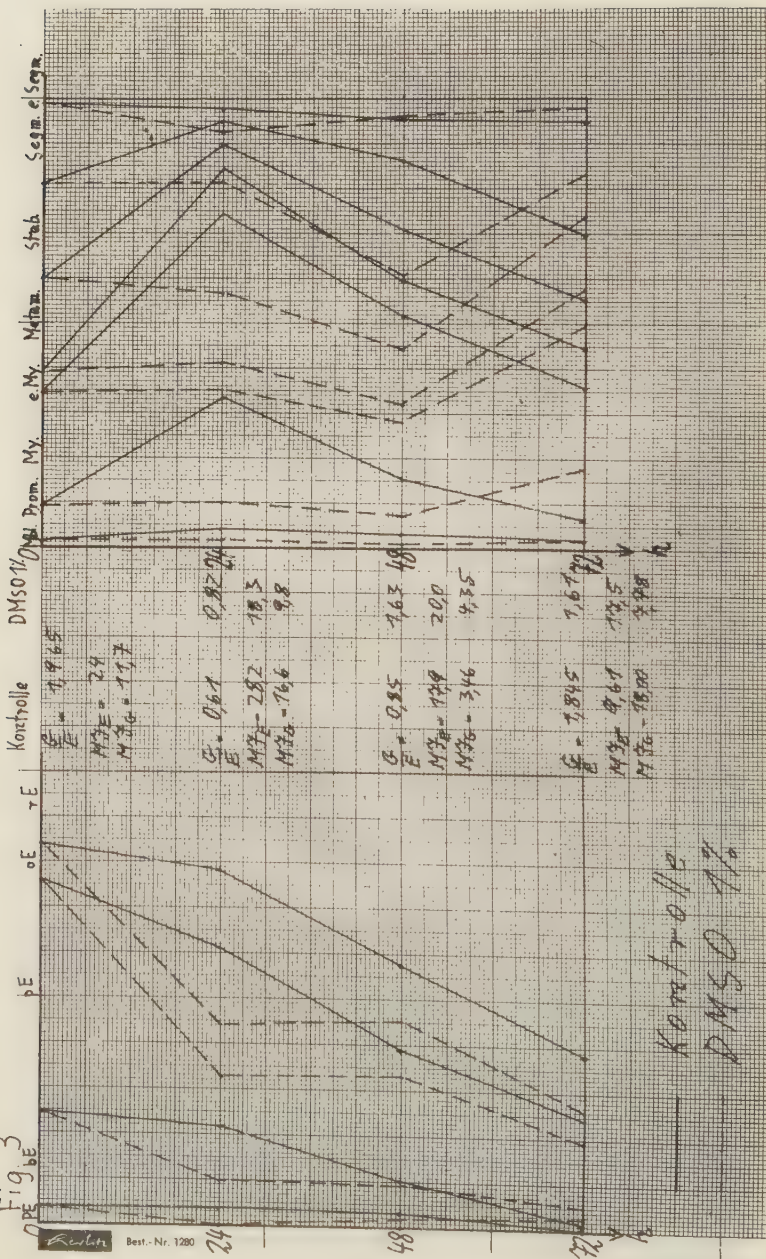


Fig. 4

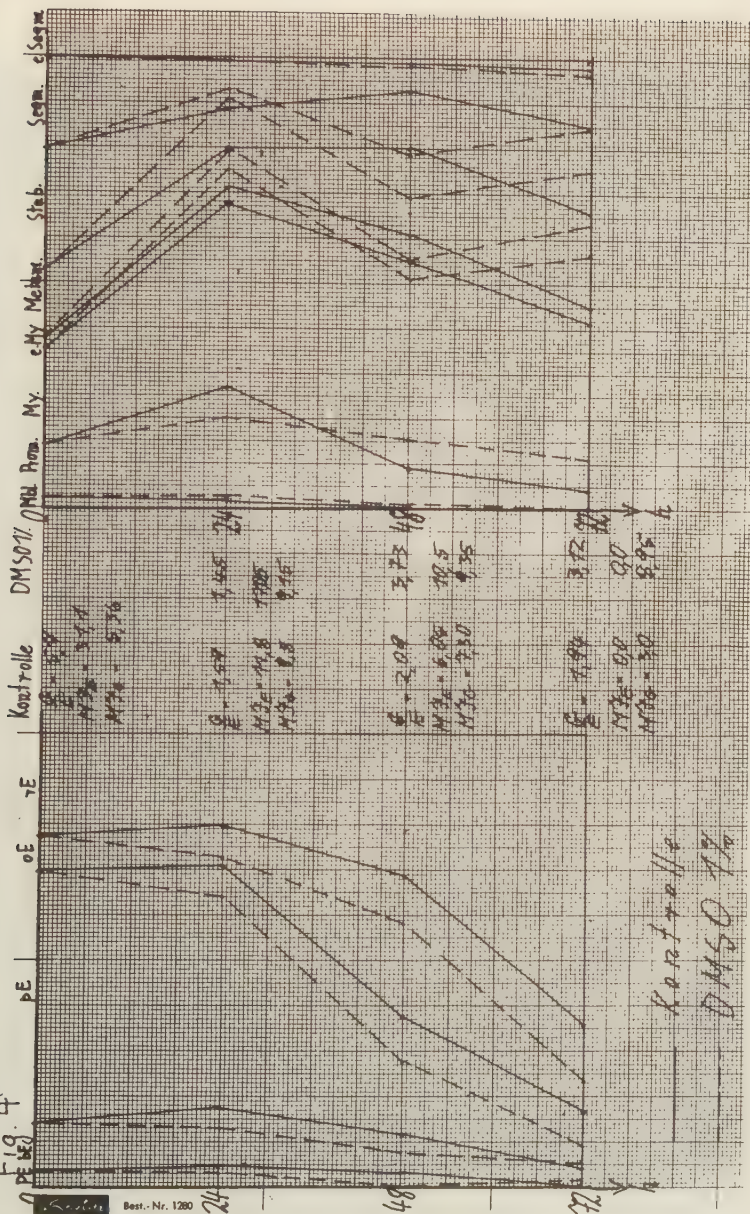
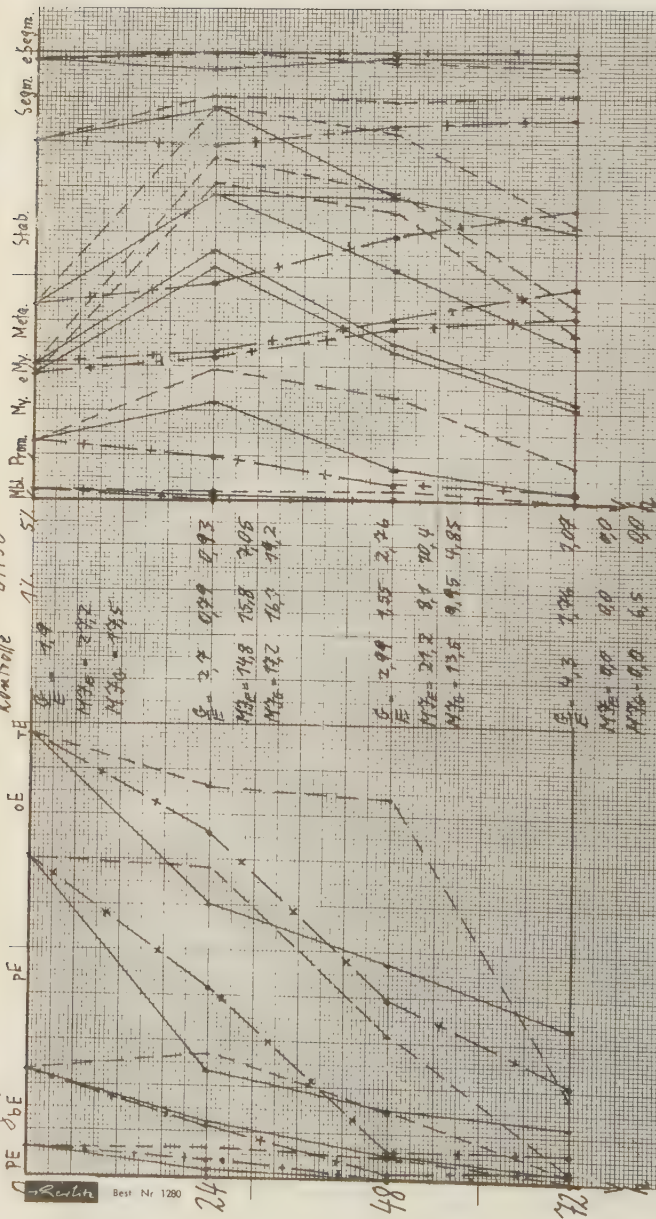


Fig. 5



Control  
DMSO 1%  
DMSO 5%

Fig. 6

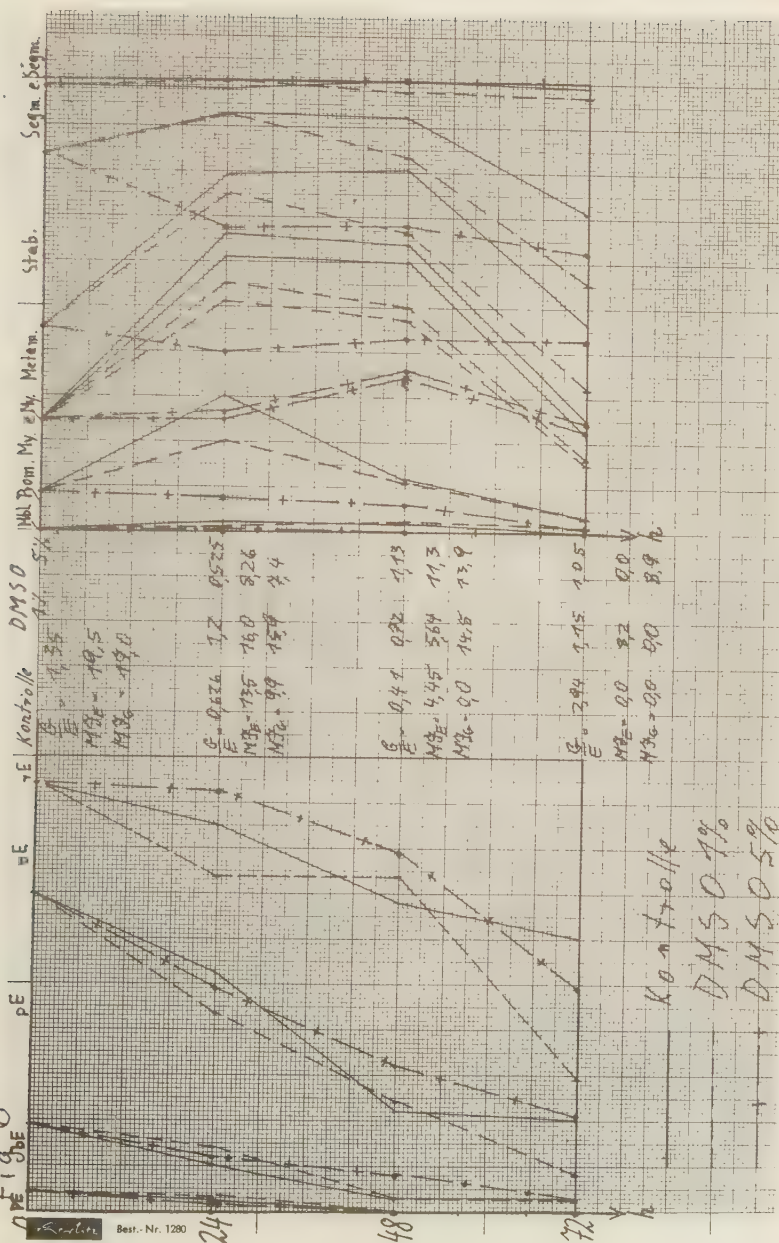
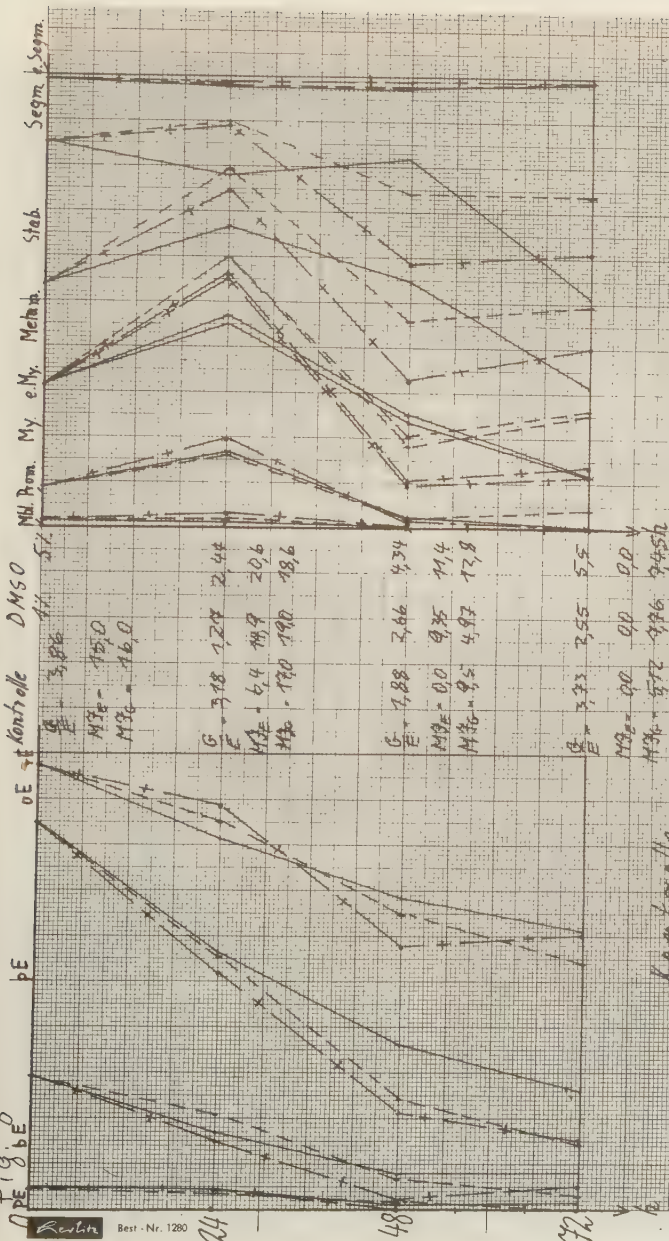




Fig. 8



Kontrolle  
DMSO 1%  
DMSO 5%  
DMSO 10%  
DMSO 24%  
DMSO 48%  
DMSO 72%

Best-Nr. 1280

Fig. 9

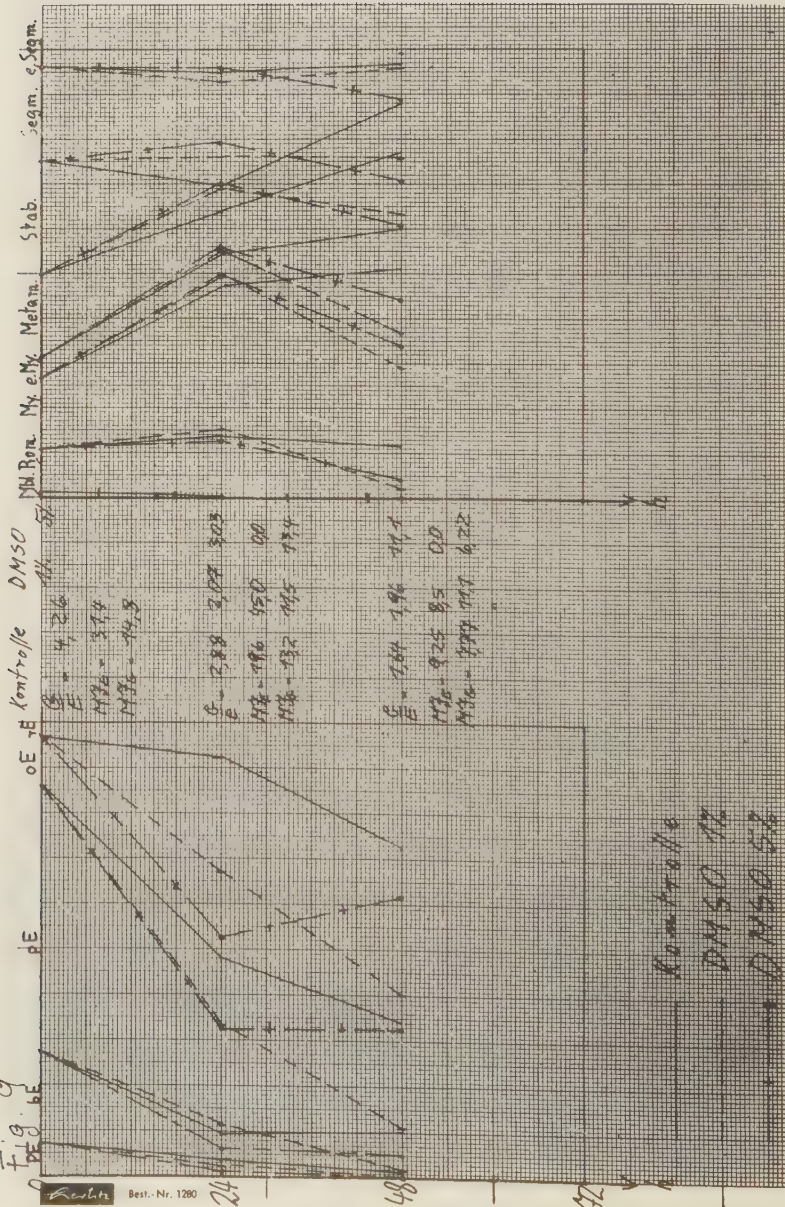
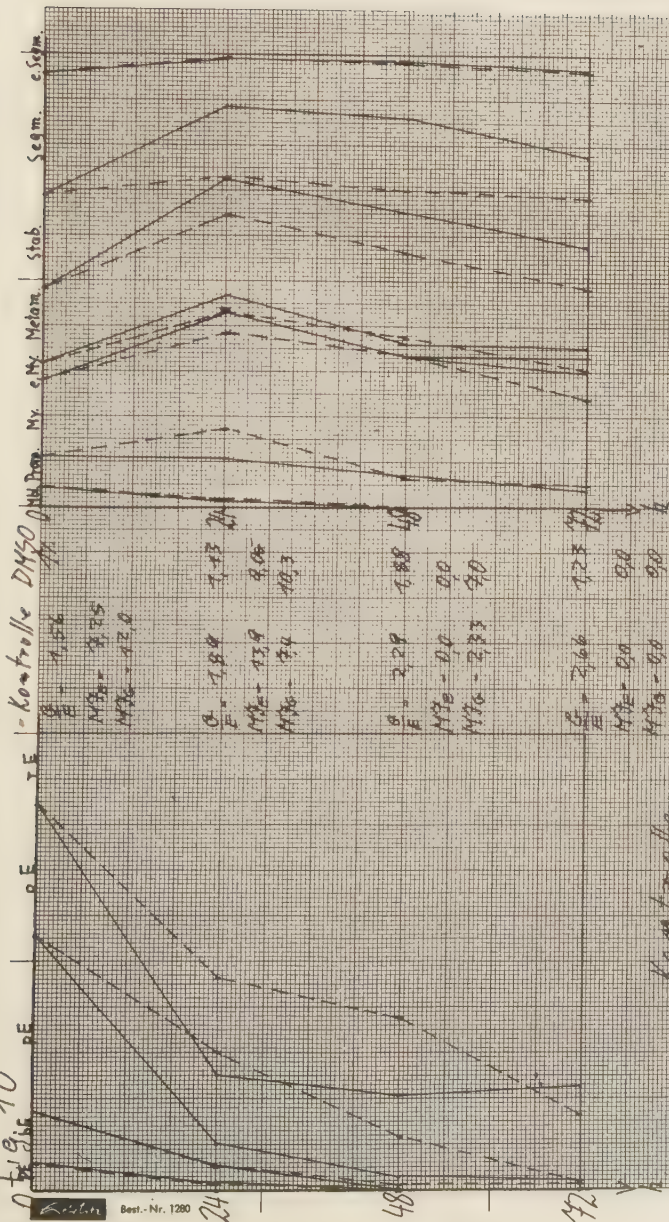


Fig. 10



Kontrolle  
DMSO 1%

Erläuterung zu Fig. 11 :

Fig. 11 ist eine Darstellung der prozentualen Häufigkeitsverteilung der einzelnen Mitosephasen ( P = Prophase, fM = frühe Metaphase, sM = späte Metaphase, A = Anaphase, T = Telophase, R = Rekonstruktionsphase ) an der Gesamtzahl der gezählten Mitosen.

Auf der Abszisse sind die Symbole der einzelnen Mitosephasen aufgetragen, auf der Ordinate die Prozentzahlen. Im oberen Teil der Zeichnung sind die Mitosen unter 1% DMSO zusammen mit denen der zugehörigen Kontrollen dargestellt, im unteren Teil entsprechend bei 5% DMSO. Links finden sich die Werte bei der Granulopoese, in der Mitte die der Erythropoese, rechts die Gesamtdarstellung.

Die Bruchzahlen bei jeder Kurve geben die Zahl der Mitosen wieder - oben im Versuch, unten in der Kontrolle - aus denen die jeweilige Kurve gebildet wurde.

Fig. 11

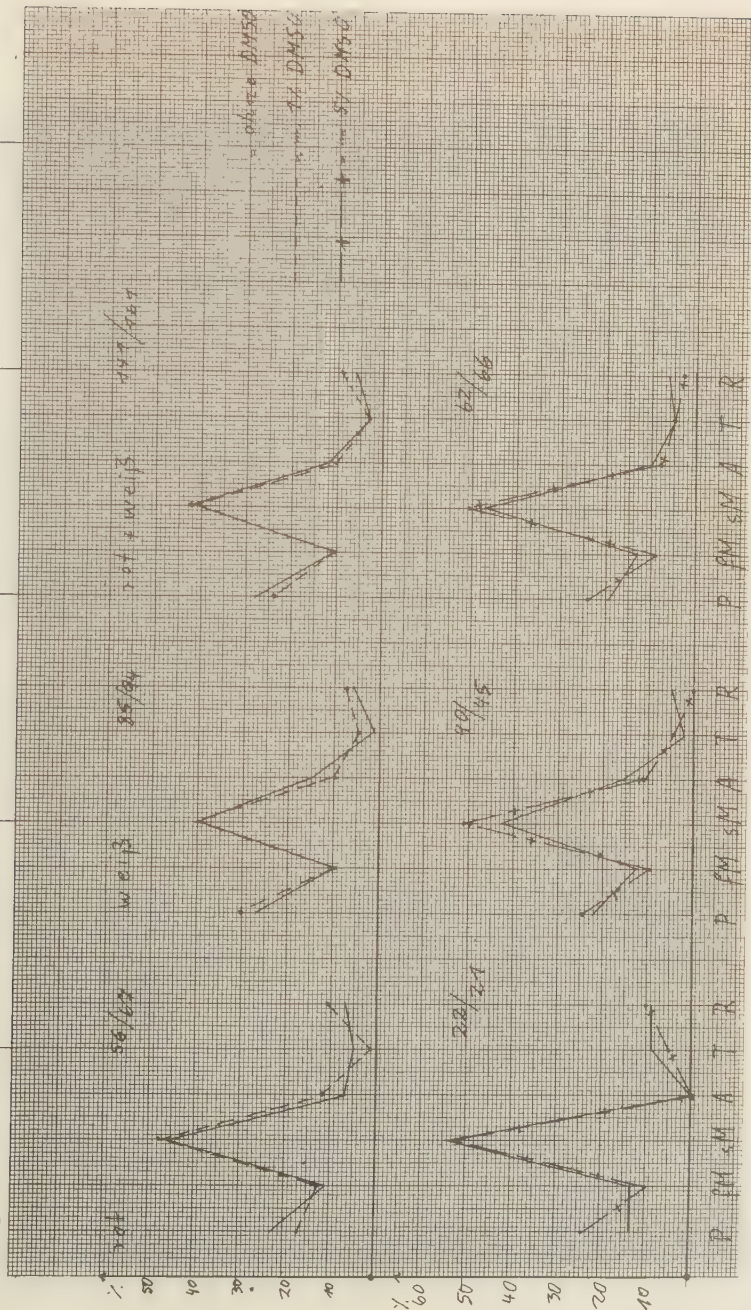


Fig. 12

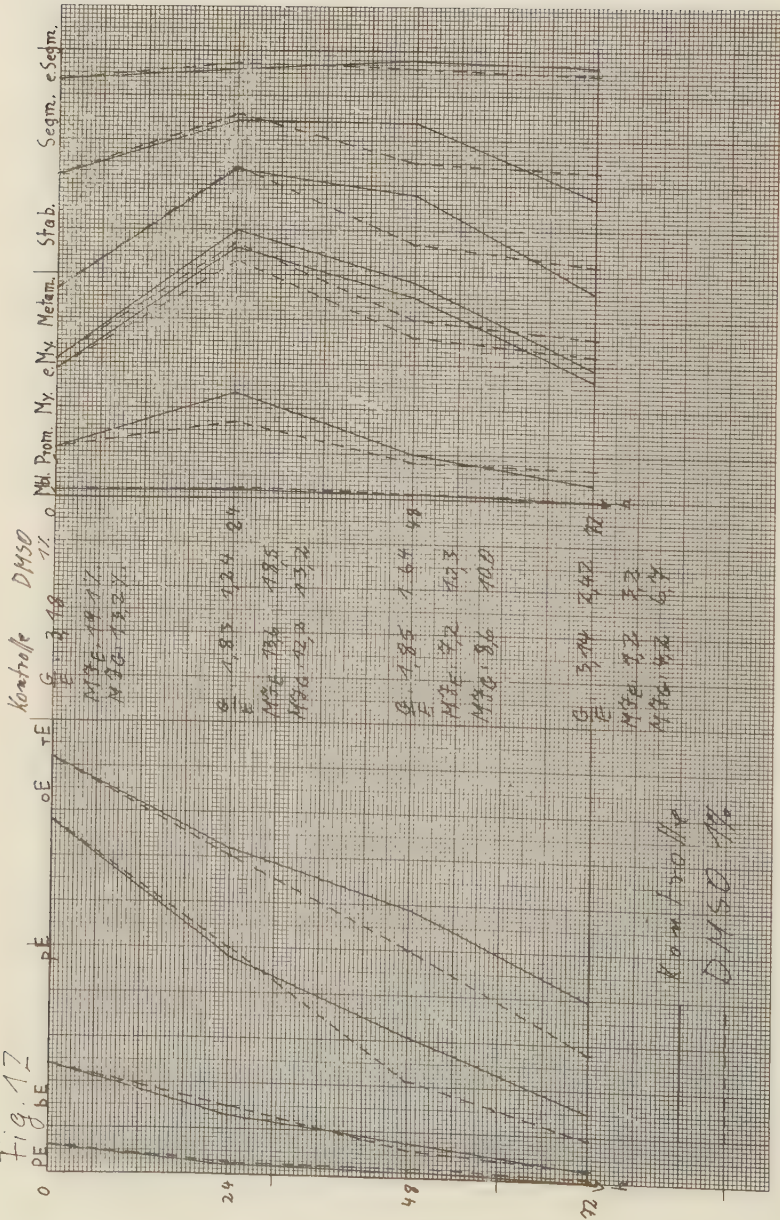


Fig. 13

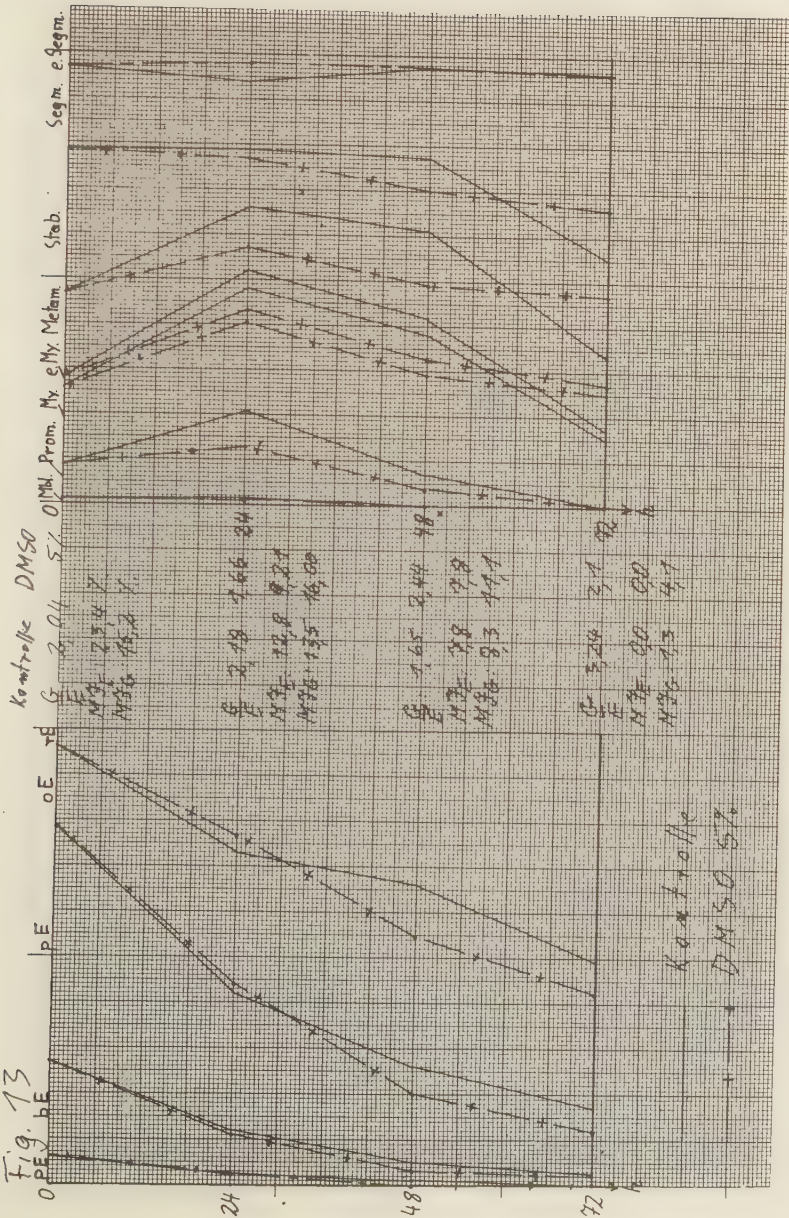
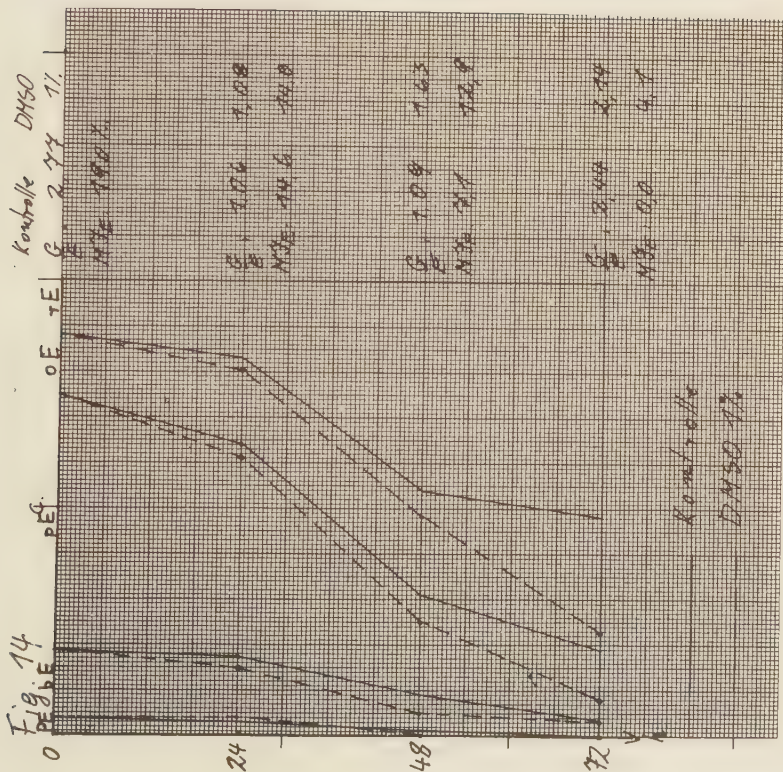




Fig. 14





Ich danke Frau Prof. Dr. I. Boll für die Überlassung des  
Themas und für die freundliche und geduldige Anleitung  
bei der Durchführung dieser Untersuchung.



## Lebenslauf

Ich wurde am 30. III. 1943 als Sohn des Augenarztes Dr. Rudolf Bornhöft und seiner Ehefrau Ilse, geb. Schlegel, in Berlin geboren. Hier besuchte ich die Grundschule und später das Rheingau-Gymnasium in Friedenau, wo ich im März 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1962 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin. 1965 bestand ich das Physikum mit der Gesamtnote "sehr gut".

Auch während der klinischen Semester blieb ich in Berlin, hier bestand ich im Frühjahr 1969 das Staatsexamen mit der Gesamtnote "sehr gut".

Danach war ich als Medizinalassistent vier Monate auf der chirurgischen Abteilung des städt. Wenkebachkrankenhauses tätig, anschließend arbeitete ich acht Monate internistisch, davon vier Monate im Klinikum Steglitz der F.U. .

Über die Pflichtzeit hinaus ging ich noch für zwei Monate an die Landesnervenklinik in Spandau.

Seit Anfang 1967 arbeitete ich im hämatologischen Labor der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack ) unter der Anleitung von Prof. Dr. I. Boll an dieser Untersuchung.





